

PGT/JP00/06222

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

12.09.00

JP00/6222

EKU

09/856979

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月30日

出願番号
Application Number:

REC'D 27 OCT 2000

WIPO PCT

平成11年特許願第279307号

出願人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2000-3083242

【書類名】 特許願

【整理番号】 991862

【提出日】 平成11年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 浜田 和行

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 中木戸 文夫

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

胞、特に莖中でRNaseとして作用し、細胞中でのタンパク質の生合成を阻害する酵素の遺伝子は、いずれも本発明の目的に使用可能である。それらの例は、膵臓由来のRNase A、*Aspergillus oryzae*由来のRNase T1、*Streptomyces aureofaciens*由来のSarnase (EP 公開特許053799号公報)等である。

【 0 0 1 4 】

RNase遺伝子上流に結合するプロモーター (第一のプロモーター) は、植物細胞中で、使用する特定のRNase遺伝子の発現を誘導する任意のプロモーターである。それらの例は、タバコのTA29プロモーター (J. Seurinck et al., Nuc. Ac. id. Res., 18, 3403, 1990)、アラビドプシスのA9プロモーター (Wyatt Paul et al., Plant Mol. Biol., 19, 611-622, 1992) などである。好ましくは、第一のプロモーターは雄性不稔性にすべき植物の莖に特異的なプロモーターであり、イネについては莖特異的なプロモーターとして、E1プロモーター、T72プロモーター、T42プロモーター (いずれもW09213956号公報記載)、Osg6Bプロモーター、Osg4Bプロモーター (いずれもT. Tsuchiya et al., Plant Mol. Biol. 26, 1737-1746, 1994) 等が知られている。E1プロモーターの配列は配列番号6に示されている。

【 0 0 1 5 】

第一のプロモーターは断片として使用することが重要である。本明細書中で、第一のプロモーターに関して断片というときは、天然に存在するプロモーターの配列と少なくとも一部が相違することを意味し、例えば、介在配列により前後に分断されている場合も含めて、3' 領域、内部領域、および/または5' 領域に欠失、置換または挿入が存在するプロモーターである。このような欠失、置換、挿入の結果、本来のプロモーター配列と90%程度まで相違する断片が好ましく、さらに好ましくは70%程度まで相違する断片が好ましく、特に好ましくは50%程度まで相違する断片が好ましい。第一のプロモーターの断片として好ましい具体例の一つは、E1プロモーター由来の、配列番号7に示す断片である。この配列中の塩基の1ないし数個が置換、欠失または挿入により修飾された配列も、配列番号7に示す断片と同様のプロモーター活性を有するかぎり、第一のプロモーターの断片として好ましい。

【 0 0 1 6 】

第一のプロモーターの断片は、RNase遺伝子の上流に機能可能に結合して使用する。機能可能とは、プロモーター要素がRNase遺伝子の発現を誘発することができる位置関係を意味する。

【0017】

本発明においては、RNase阻害蛋白質遺伝子を使用することも重要である。これは使用するRNase遺伝子に応じて適宜選択され、例えばRNase遺伝子がバルナーゼ遺伝子である場合に、好ましいRNase阻害蛋白質遺伝子はバースター遺伝子である。RNase阻害蛋白質遺伝子の上流には、第二のプロモーターを機能可能に結合する。第二のプロモーターは植物細胞中で、使用するRNase阻害蛋白質遺伝子の発現を誘発するものであり、第一のプロモーターと同じであっても異なってもよい。但し、第一のプロモーターと同じものを用いる場合、必ずしも断片として使用することは要しない。

【0018】

本発明の方法により雄性不稔化することができる植物は特に限定されないが、例えば、イネ、トウモロコシ、タバコ、レタス、ナタネ等を挙げることができる。特に、イネおよびトウモロコシが好ましい。

【0019】

本発明において植物を雄性不稔化するために、植物細胞のゲノムに遺伝子を導入するための方法は、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。好ましい方法はアグロバクテリウム法である。その具体的方法は、例えばPCT国際公開W092/13957に記載の方法を参照して、当業者が適宜決定してよい。一例を示せば、次の工程により植物細胞のゲノムに遺伝子を導入することができる：

- (1) 第一のプロモーターの断片を用意し、
- (2) RNase遺伝子を用意し、
- (3) 第一のプロモーター断片の下流にRNase遺伝子を機能可能に結合し、
- (4) 第二のプロモーターを用意し、
- (5) RNase 阻害蛋白質遺伝子を用意し、
- (6) 第二のプロモーターの下流にRNase阻害蛋白質遺伝子を機能可能に結合し

(7) 第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、制限酵素部位を利用してT-DNAに組み込み、

(8) 工程(7) のT-DNAを、Tiプラスミド中に存在させ、

(9) 必要であれば、工程(8) のTiプラスミドをアグロバクテリウム細菌中で増幅し、

(10) 工程(9) のアグロバクテリウム細菌を、植物細胞に感染させて、第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子および第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、該植物細胞のゲノムに導入する。

【 0 0 2 0 】

形質転換した植物細胞は、カルス培養から出発して完全な植物体に再生することができる。その方法は、例えばY. Hiei et al., Plant J. 6, 271-282: 1994 に記載されている。

【 0 0 2 1 】

上記工程において、第一のプロモーターの断片の調製は、第一のプロモーターを適当な制限酵素で切断することにより行ってもよく、あるいは、後記実施例に示すように、第一のプロモーターとRNase遺伝子を含むプラスミドから、PCRにより、プライマーを適宜選択して不要な領域を除いた配列のみを増幅させてもよい。また、上記工程、特に(1) ～(7) の順序や、材料を適宜変更することは本発明の範囲内である。また、第一のプロモーター断片の下流に結合したRNase遺伝子と第二のプロモーターの下流に結合したRNase阻害蛋白質遺伝子を、別々に組み込んだT-DNAを含む、別々のTiプラスミドを用いて、植物細胞の形質転換を行うこともできる。さらに、上記工程(7) のT-DNAに予め選抜マーカールを含めておけば、目的の遺伝子が導入されたカルスの選抜を容易にすることができる。そのようなマーカールの例として、後述の実施例で用いるBar遺伝子、あるいはハイグロマイシン耐性(HPT)遺伝子が挙げられる。しかし、選抜マーカールの使用は必須ではなく、形質転換植物細胞から生じたカルスから再生した植物が雄性不稔化されていることを、形質転換が達成されたことの指標としてもよい。

【 0 0 2 2 】

本発明は、上記アグロバクテリウム法により、植物細胞のゲノムに目的の遺伝子を導入するためのベクターも提供する。該ベクターは、i) プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子、を含むT-DNAを有し、植物細胞に感染したアグロバクテリウム細菌中に存在するとき該植物細胞のゲノムに前記T-DNAを導入することができるベクターである。好ましくは、本発明のベクターは、植物形質転換用のTiプラスミドに、上記i)およびii)の遺伝子要素を含むT-DNAを組み込んでなるものである。植物形質転換用のTiプラスミドは、種々のものが知られまた入手可能であるが、例えば、LBA4404株の持つpAL4404が挙げられる。本発明のベクターは、必要に応じて、アグロバクテリウム細菌中で増幅するための複製開始点、RNA分解酵素遺伝子およびRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子の各下流のターミネーター、および／または形質転換された植物細胞の選抜のために適するマーカー遺伝子の一つ以上を含んでもよい。

【 0 0 2 3 】

本発明はさらに、i) プロモーターの断片とそれにより発現誘導されるRNA分解酵素遺伝子、およびii) 前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターとそれにより発現誘導されるRNA分解酵素阻害蛋白遺伝子を、本発明の方法でゲノムに導入されて含む形質転換植物細胞、および該細胞から再生された雄性不稔植物も提供する。

【 0 0 2 4 】

【発明の効果】

上流部の欠失により活性の低減されたプロモーターにバルナーゼ遺伝子を結合し、さらにイネ蒴特異的プロモーターに結合されたバースター遺伝子を同時導入することにより、従来のコンストラクトでみられた形態や開花特性の異常の少ない雄性不稔植物の作出が可能になった。

【 0 0 2 5 】

以下、実施例に基づいて、本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例のみに

限定されるものではない。

【 0 0 2 6 】

【実施例】

実施例

E1プロモーターの断片の下流に結合したバルナーゼ遺伝子を増幅させるための鑄型としてプラスミドpTS172（特願平10-220060）を使用した。プライマーとして内部にPstI切断部位を持つ172del-F（配列番号 1）と172del-R（配列番号 2）を用いて、PCR 法により増幅を行なった後、制限酵素PstIで処理した。その結果、両端にPstIの粘着末端を持ち、かつpTS172のE1プロモーターのうち翻訳開始点の上流約360bp を残してそれ以外を欠いた断片が得られた。この断片の両端をを常法によりT4 DNAライゲースによって結合することで再び環状化し、新規のプラスミドpTS172Δ（配列番号 3）とした。

【 0 0 2 7 】

pTS172ΔのPstI部位にE1プロモーター（PCT出願国際公開第9213956 号）とバースター遺伝子（R.W.Hartley J.Mol.Biol. 202, 913-915 : 1988）を結合した断片（配列番号 4）を平滑化して組み込み、これをpTS346（配列番号 5）とした。pTS346の構造を、図 1 に模式的に示す。

【 0 0 2 8 】

pTS346から制限酵素EcoRI により、5.5 kbの断片を切り出し、pSB11BS（構造はすぐ後に説明する）のEcoRI 部位に挿入し、更に相同組換えによりそのT-DNA領域をacceptor vector pSB1（T.Komari et al., Plant J.10, 165-174:1996）に組み込んだ。この組換え型プラスミド（pSB1346）を持つ*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 をイネ（品種朝の光）の形質転換に用いた。pSB11BS は中間ベクター-pSB11（T.Komari Plant J. 10, 165-174:1996）のStuI部位にバースター遺伝子（R.W.Hartley J.Mol.Biol. 202, 913-915 : 1988）を組み込んだものである。

【 0 0 2 9 】

この組換え型プラスミドをもつ*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 をイネ（品種アサノヒカリ）に形質転換した。形質転換の方法は、基本的にHieiらの方法（Hiei et al., Plant J. 6, 271-282:1994）に従ったが、構築した雄性不稔遺伝

子が選抜マーカーとしてbar 遺伝子 (phosphinothricin acetyl transferase をコードする) を含んでいるので、遺伝子が導入されたカルスを選抜するためにphosphinothricin (濃度10 mg/L) を用いた。

【0 0 3 0】

通常の長さのE1プロモーターを利用し、かつバースター遺伝子は使用していないコンストラクトpSB1172 (1999年8月3日出願の、PCT/JP99/04167明細書参照) を導入した場合と比較すると、形質転換の効率、形態の正常な形質転換体の割合は表のように顕著に改善された。

【0 0 3 1】

【表 1】

表：形質転換効率

	感染カルス数	再分化 カルス数	PCR 陽性 系統数	形態の正常な 雄性不稔系統数	
pSB1346	681	45	37/38 [*]	15/37	40.5%
pSB1172 (対照)	2838	83	52/83	9/52	17.3%

^{*}:45 系統のうち38系統を調査

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> Method for producing male-sterile plant

<130> 991862

<160> 7

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-F

<400> 1

ggctgcagtg cggccgctag cctaggcccg ggcccacaaa aatctg

46

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 172del-R

<400> 2

gggctgcagt cagccagcca gaccaatggg ggcaaaattt ac

42

<210> 3

<211> 5228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS172Δ

<400> 3

```

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatittgt   60
ttatittttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg   120
cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt   180
cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta   240
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc   300
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa   360
gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc   420
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt   480
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact   540
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac   600
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata   660
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta   720
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg   780
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat   840
aatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt   900
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga   960
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag 1080
gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140
cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg 1200

```

cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggt ttgtttgccg 1260
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500
 acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560
 ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 1620
 ccggtaaagc gcaggggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc 1800
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920
 cgcagcaggt cagttagcga ggaagcgga gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttccc atctagtaac atagatgaca 2040
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatctt gttttctatc gcgtattaaa 2100
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160
 tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220
 cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg 2280
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggct tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacagc 2340
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa ttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgccc gggagtttgc cttccctgtt tgagaagatg 2460
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag 2520
 ccgagggctt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580
 agataatccg caaccccgctc aaacgtgttg ataaccggta ccatcgcgac ggcttgatgg 2640
 atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700
 tttttaggc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc 2760
 gcaagtgact gcaacaacca aggacggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgtccc gtccattagg tgcattctca 2880
 ccgttggcca gaacaggacc gtccaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggtta 2940

atgtatggca aatagtagta aatitttggcc ccatttggctt ggctgactgc aggcggccgc 3000
 tagcctaggc ccggggccac aaaaatctga gcttaacagc acagttgctc ctctcagagc 3060
 agaatcgggt attcaacacc ctcatatcaa ctactacgtt gtgtataacg gtccacatgc 3120
 cggatatatac gatgactggg gttgtacaaa ggccggcaaca aacggcgctc ccggagttgc 3180
 acacaagaaa ttgtccacta ttacagaggc aagagcagca gctgacgcgt acacaacaag 3240
 tcagcaaaaca gacaggttga acttcatccc caaaggagaa gctcaactca agcccaagag 3300
 ctttgctaag gccctaacaa gcccaccaaa gcaaaaagcc cactgggtca cgctaggaac 3360
 caaaaggccc agcagtgatc cagccccaaa agagatctcc ttgtccccgg agattacaat 3420
 ggacgatttc ctctatcttt acgatctagg aaggaagttc gaaggtgaag gtgacgacac 3480
 tatgttcacc actgataatg agaaggttag cctcttcaat ttcagaaaga atgctgacct 3540
 acagatgggt agagaggcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagtaacaa 3600
 tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac 3660
 taattgcac aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta ctattccagt 3720
 atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa 3780
 aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa atcgaggatc 3840
 taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 3900
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg agcacgacac tctggtctac tccaaaaatg 3960
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa aggataattt 4020
 cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag 4080
 aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcattcaag 4140
 atgcctctgc cgacagtggc ccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 4200
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc tccactgacg 4260
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata taaggaagtt 4320
 catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctataaat ctatctctct 4380
 ctctataacc atggacctag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga 4440
 catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg 4500
 taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta 4560
 tccctggctc gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atgcctacg cgggccccctg 4620
 gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgcca 4680

ccagcggacg ggactgggct ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 4740
 gggcttcaag agcgtggtcg ctgtcatcgg gctgcccac gacccgagcg tgcgcatgca 4800
 cgaggcgctc ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa 4860
 ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt 4920
 cctgcccgtc accgagatct gagatcacgc gttctaggat ccccgatga gctaagctag 4980
 ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatcgcactc agtctttcat ctacggcaat 5040
 gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat 5100
 ttatgttttt gcttggacta taataacctga cttgttattt tatcaataaa tatttaaact 5160
 atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc ttttcttate gaccatgtac 5220
 gtatcgcg 5228

<210> 4

<211> 2275

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E1-barstar-3' nos

<400> 4

gaattcatat gcacgtgttc ccgatctagt aacatagatg acaccgcgcg cgataattta 60
 tcctagtttg cgcgtatat tttgttttct atcgcgtatt aaatgtataa ttgcgggact 120
 ctaatcataa aaacccaatct cataaataac gtcattgcatt acatgttaat tattacatgc 180
 ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata atcatcgcaa gaccggcaac aggattcaat 240
 cttagaaac tttattgcca aatgtttgaa cgatctgctt cggaggttac cttagaaag 300
 tatgatggtg atgtcgcagc ctccgcttt cgcttcacgg aaaacctgaa gcacactctc 360
 ggcgccattt tcagtcagct gcttgctttg ttcaaactgc ctccattcca aaacgagcgg 420
 gtactccacc catccggtca gacaatccca taaagcgtcc aggttttcac cgtagtattc 480

cggaagggca agctcctttt tcaatgtctg gtggaggtcg ctgatacttc tgatttgttc 540
 cccgttaatg actgcttttt tcatcgcgac ggcttgatgg atctcttgct ggacaccggg 600
 atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc tttttaggc gccggcgacg 660
 gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc gcaagtgact gcaacaacca 720
 aggacgggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct acaggatgta gcagtagcac 780
 ggtgaaagaa gtgttgctcc gtccattagg tgcattctca ccgttggcca gaacaggacc 840
 gticaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggta atgtatggca aatagtagta 900
 aattttgccc ccattggctt ggctgagata gaacatattc tggaaagcct ctagcatatc 960
 ttttttgaca gctaaacttt gcttcttgcc ttcttggctt agcaatgacg ttgcccatgt 1020
 cgtggcaaac atctggtaag gtaactgtat tcgtttgttc ccttcaacgg ctcaatcccc 1080
 acaggccaag ctatcctttc cttggcagta taggctcctt gagagattat actaccattt 1140
 ttaagtgtt ataaagacga tgctctctaa ccagatcgat cagaaacaca aagtttttagc 1200
 agcgtaatat cccacacaca tacacacacg aagctatgcc tcctcatttt ccgagagatt 1260
 ctgacagtga ccagaatgtc agaatgccat ttcatgggca caagtcgac cacaagcttc 1320
 ttggtggagg tcaaggtgtg ctattattat tcgctttcta ggaaattatt cagaattagt 1380
 gccttttate ataacttctc tctgagccga tgttggtttg gatttcattg ttgggagcta 1440
 tgcagttgcg gatattctgc tgtggaagaa caggaactta tctgcggggg tccttgctgg 1500
 ggcaacattg atatggttcc tgttcgatgt agtagaatac aatataattc cgctcctttg 1560
 ccagattgcc attcttgcca tgcttgtgat cttcatttgg tcaaagccg caccactctt 1620
 ggacaggtat tagctttatt tcctgtggag atggtagaaa actcagctta cagaaatggc 1680
 atttcacgta gtataacgca agacattagg tactaaaact caactaactg tttccgaatt 1740
 tcaggggccc tccaaggatc ccagaaatca tcatctctga acatgccttc agagaaatgg 1800
 cattgaccgt ccattacaaa ctaacgtaca ctgtatctgt tctttacgac attgcatgtg 1860
 gaaaggatct gaagagattt ctcttggtac ataataatct actcctttgc tacgttaata 1920
 agagatgtaa aaacatgcaa cagttccagt gccaacattg tccaaggatt gtgcaattct 1980
 ttctggagcg ctaaaattga ccagattaga cgcatcagaa tattgaattg cagagttagc 2040
 caataatcct cataatgtta atgtgctatt gtgttctact actcaatata gtcttgact 2100
 aacaatcaga ttgtttatga tattaagggt gtggatctc tattggtatt gtcggcgatt 2160
 ggaagtctt gcagcttgac aagtctacta tatattggta ggtattccag ataaatatta 2220

aattttaata aaacaatcac acagaaggat ctgcggccgc tagcctaggc ccggg 2275

<210> 5

<211> 7492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid pTS346

<400> 5

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60
 ttatTTTTtct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 120
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 180
 ccctTTTTtTg cggcattttg ccttcctgtt ttgtctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 240
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 420
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac 600
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaac cggagctgaa tgaagccata 660
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 840
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020

gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag 1080
 gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140
 cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg 1200
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtggg ttgtttgccg 1260
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1440
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560
 ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat 1620
 ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 1800
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920
 cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcatatgca cgtgttcccg atctagtaac atagatgaca 2040
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa 2100
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160
 tgttaattat tacatgctta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220
 cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg 2280
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggct tgataatggc ccgttgtttt gtaaatacgc 2340
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc 2400
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttgccc gggagtttgc cttccctgtt tgagaagatg 2460
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag 2520
 ccgagggtt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580
 agataatccg caaccccgtc aaacgtgttg ataaccggtg ccatcgcgac ggcttgatgg 2640
 atctcttgct ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgtg cgtgtgtggc 2700
 tttttagtagc gccggcgacg gcgggggcaa tgtggcaggt gagtcacggt gcaagcgtgc 2760

gcaagtgact gcaacaacca aggacgggtca tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgttgtccc gtccattagg tgcatttctca 2880
 ccgttggcca gaacaggacc gticaacagt taggttgagt gtaggacttt tacgtggtta 2940
 atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccattgggtct ggctgacaat tcataigcac 3000
 gtgttcccga tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat aatttatcct agtttgcgcg 3060
 ctatattttg ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac 3120
 ccatctcata aataacgtca tgcattacat gttaattatt acatgcttaa cgtaattcaa 3180
 cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta 3240
 ttgccaaatg ttigaacgat ctgcttcgga ggttacctta agaaagtatg atggatgatgt 3300
 cgcagccttc cgctttcgtc tcacggaaaa cctgaagcac actctcggcg ccattttcag 3360
 tcagctgctt gctttgttca aactgcctcc attccaaaac gagegggtac tccaccatc 3420
 cggtcagaca atcccataaa gcgtccaggt tttcacctga gtattccgga agggcaagct 3480
 cctttttcaa tgtctgggtg aggtcgctga tacttctgat ttgttccccg ttaatgactg 3540
 cttttttcat cgcgacggct tgatggatct cttgctggac accgggatgc taggatgggt 3600
 tatcgtggcc ggcgtgcgtg tgtggctttt gtaggcgccg gcgacggcgg gggcaatgtg 3660
 gcaggtgagt cacggtgcaa gcgtgcgcaa gtgactgcaa caaccaagga cggtcattgc 3720
 gaaagcacct cacgcgtcca ccgtctacag gatgtagcag tagcacgggt aaagaagtgt 3780
 tgtcccgtcc attaggtgca ttctcacctg tggccagaac aggaccgttc aacagttagg 3840
 ttgagtgtag gacttttacg tggttaatgt atggcaaata gtagtaaatt ttgccccat 3900
 tggctctggct gagatagaac atattctgga aagcctctag catatctttt ttgacagcta 3960
 aactttgctt cttgccttct tggcttagca atgacgttgc ccatgtcgtg gcaaacatct 4020
 ggtaaggtaa ctgtattcgt ttgttcctt caacggctca atcccacag gccaaagctat 4080
 cttttccttg gcagtatagg ctcttgaga gattatacta ccatttttaa gtgcttataa 4140
 agacgatgct ctctaaccag atcgatcaga aacacaaagt tttagcagcg taatatccca 4200
 cacacataca cacacgaagc tatgcctcct cattttccga gagattctga cagtgaccag 4260
 aatgtcagaa tgccatttca tgggcacaag tcgatccaca agcttcttgg tggaggtcaa 4320
 ggtgtgctat tattattcgc tttctaggaa attattcaga attagtgcct tttatcataa 4380
 cttctctctg agccgatgtg gttttggatt tcattgttgg gagctatgca gttgcggata 4440
 ttctgctgtg gaagaacagg aacttatctg cgggggtcct tgctggggca acattgatat 4500

ggcticctgtt cgatgtagta gaatacaata taattccgct cctttgccag attgccattc 4560
 ttgccatgct tgtgatcttc atttgggtcaa atgccgcacc actcttggac aggtatttagc 4620
 tttatttcct gtggagatgg tagaaaactc agcttacaga aatggcattt cacgtagtat 4680
 aacgcaagac attaggtact aaaactcaac taactgtttc cgaatttcag ggcccctcca 4740
 aggatcccag aaatcatcat ctctgaacat gccttcagag aaatggcatt gaccgtccat 4800
 tacaactaa cgtacactgt atctgttctt tacgacattg catgtggaaa ggatctgaag 4860
 agatttctcc tggtagataa taatctactc ctttgctacg ttaataagag atgtaaaaac 4920
 atgcaacagt tccagtgcc aattgtcca aggattgtgc aattctttct ggagcgctaa 4980
 aattgaccag attagacgca tcagaatatt gaattgcaga gttagccaat aatcctcata 5040
 atgttaatgt gctattgttg ttcactactc aatatagttc tggactaaca atcagattgt 5100
 ttatgatatt aagggtgttg gatctctatt ggtattgtcg gcgattggaa gttcttgcag 5160
 cttgacaagt ctactatata ttggtaggta ttccagataa atattaaatt ttaataaaac 5220
 aatcacacag aaggatctgc ggccgctagc ctaggcccgg ccgctagcct aggcccgggc 5280
 ccacaaaaat ctgagcttaa cagcacagtt gctcctctca gagcagaatc gggatttcaa 5340
 caccctcata tcaactacta cgttgtgtat aacgggtccac atgccggtat atacgatgac 5400
 tggggttgta caaaggcggc aacaaacggc gttcccggag ttgcacacaa gaaatttgcc 5460
 actattacag aggcaagagc agcagctgac gcgtacacaa caagtcagca aacagacagg 5520
 ttgaacttca tcccaaagg agaagctcaa ctcaagccca agagctttgc taaggcccta 5580
 acaagcccac caaagcaaaa agcccactgg ctacgctag gaaccaaag gccagcagt 5640
 gatccagccc caaaagagat ctcttttgcc ccggagatta caatggacga tttcctctat 5700
 ctttacgac taggaaggaa gticgaaggt gaaggtagc acactatgtt caccactgat 5760
 aatgagaagg ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag 5820
 gcctacgcag caggtctcat caagacgac taccgagta acaatctcca ggagatcaaa 5880
 taccttcca agaaggttaa agatgcagtc aaaagattca ggactaattg catcaagaac 5940
 acagagaaag acatatttct caagatcaga agtactattc cagtatggac gattcaaggc 6000
 ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaaaaagg agttcctact 6060
 gaatctaagg ccatgcatgg agtctaagat tcaaatacgag gatctaacag aactcgccgt 6120
 gaagactggc gaacagttca tacagagtct ttacgactc aatgacaaga agaaaatctt 6180
 cgtcaacatg gtggagcacg acactctggt ctactccaaa aatgtcaaag atacagtctc 6240

agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaaggata atttcgggaa acctcctcgg 6300
 attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aaggtggctc 6360
 ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcatt caagatgcct ctgccgacag 6420
 tggtcceaaa gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 6480
 cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga catctccact gacgtaaggg atgacgcaca 6540
 atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga agttcatttc atttgagag 6600
 gacacgctga aatcaccagt ctctctctat aaatctatct ctctctctat aaccatggac 6660
 ccagaacgac gcccggccga catccgccgt gccaccgagg cggacatgcc ggcggtctgc 6720
 accatcgtca accactacat cgagacaagc acggtcaact tccgtaccga gccgcaggaa 6780
 ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt ctgcgggagc gctatccctg gctcgtcgcc 6840
 gaggtggacg gcgaggtcgc cggcatcgcc tacgcgggcc cctggaaggc acgcaacgcc 6900
 tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac gtctcccccc gccaccagcg gacgggactg 6960
 ggctccacgc tctacacca cctgctgaag tccctggagg cacagggctt caagagcgtg 7020
 gtcgctgtca tcgggctgcc caacgacccg agcgtgcgca tgcacgaggc gctcggatat 7080
 gccccccgcg gcatgctgcg ggccggccggc ttcaagcacg ggaactggca tgacgtgggt 7140
 ttctggcagc tggacttcag cctgccggta ccgccccgtc cggtcctgcc cgtcaccgag 7200
 atctgagatc acgcgttcta ggatcccccg atgagctaag ctagctatat catcaattta 7260
 tgtattacac ataatatcgc actcagtctt tcatctacgg caatgtacca gctgatataa 7320
 tcagttattg aaatatctct gaatttaaac ttgcatcaat aaatttatgt ttttgcttgg 7380
 actataatac ctgacttggt attttatcaa taaatatitaa aactatatit ctttcaagat 7440
 gggaattaac atctacaaat tgccttttct tatcgaccat gtacgtatcg cg 7492

<210> 6

<211> 1695

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> El pr moter

<400> 6

CCGCAGATCC TTCTGTGTGA TTGTTTTATT AAAATTTAAT ATTTATCTGG AATACCTACC 60
 AATATATAGT AGACTTGTCA AGCTGCAAGA ACTTCCAATC GCCGACAATA CCAATAGAGA 120
 TCCAACCACC TTAATATCAT AAACAATCTG ATTGTTAGTC CAGAACTATA TTGAGTAGTG 180
 AACACAATA GCACATTAAC ATTATGAGGA TTATTGGCTA ACTCTGCAAT TCAATATTCT 240
 GATGCGTCTA ATCTGGTCAA TTTTAGCGCT CCAGAAAGAA TTGCACAATC CTTGGACAAT 300
 GTTGGCACTG GAACTGTTGC ATGTTTTTAC ATCTCTTATT AACGTAGCAA AGGAGTAGAT 360
 TATTATGTAC CAGGAGAAAT CTCTTCAGAT CCTTTCCACA TGCAATGTCTG TAAAGAACAG 420
 ATACAGTGTA CGTTAGTTTG TAATGGACGG TCAATGCCAT TTCTCTGAAG GCATGTTTCTG 480
 AGATGATGAT TTCTGGGATC CTTGGAGGGG CCCTGAAATT CGGAAACAGT TAGTTGAGTT 540
 TTAGTACCTA ATGTCTTGCG TTATACTACG TGAAATGCCA TTTCTGTAAG CTGAGTTTTC 600
 TACCATCTCC ACAGGAAATA AAGCTAATAC CTGTCCAAGA GTGGTGCGGC ATTTGACCAA 660
 ATGAAGATCA CAAGCATGGC AAGAATGGCA ATCTGGCAAA GGAGCGGAAT TATATTGTAT 720
 TCTACTACAT CGAACAGGAA CCATATCAAT GTTGCCCCAG CAAGGACCCC CGCAGATAAG 780
 TTCCTGTTCT TCCACAGCAG AATATCCGCA ACTGCATAGC TCCCAACAAT GAAATCCAAA 840
 ACCACATCGG CTCAGAGAGA AGTTATGATA AAAGGCACTA ATTCTGAATA ATTTCTCTAGA 900
 AAGCGAATAA TAATAGCACA CCTTGACCTC CACCAAGAAG CTTGTGGATC GACTTGTGCC 960
 CATGAAATGG CATTCTGACA TTCTGGTCAC TGTCAGAATC TCTCGGAAAA TGAGGAGGCA 1020
 TAGCTTCGTG TGTGTATGTG TGTGGGATAT TACGCTGCTA AAACTTTGTG TTTCTGATCG 1080
 ATCTGGTTAG AGAGCATCGT CTTTATAAGC ACTTAAAAAT GGTAGTATAA TCTCTCAAGG 1140
 AGCCTATACT GCCAAGGAAA GGATAGCTTG GCCTGTGGGG ATTGAGCCGT TGAAGGGAAC 1200
 AAACGAATAC AGTTACCTTA CCAGATGTTT GCCACGACAT GGGCAACGTC ATTGCTAGAC 1260
 CAAGAAGGCA AGAAGCAAAG TTTAGCTGTC AAAAAAGATA TGCTAGAGGC TTTCCAGAAT 1320
 ATGTTCTATC TCAGCCAGAC CAATGGGGGC AAAATTTACT ACTATTTGCC ATACATTAAC 1380
 CACGTAAAAG TCCTACACTC AACCTAACTG TTGAACGGTC CTGTTCTGGC CAACGGTGAG 1440
 AATGCACCTA ATGGACGGGA CAACACTTCT TTCACCGTGC TACTGCTACA TCCTGTAGAC 1500
 GGTGGACGCG TGAGGTGCTT TCGCCATGAC CGTCCTTGGT TGTTGCAGTC ACTTGCGCAC 1560

GCTTGCACCG TGA CTCACCT GCCACATTGC CCCC GCCGTC GCCGGCGCCT AAAAAAGCCA 1620
CACACGCACG CCGGCCACGA TAACCCATCC TAGCATCCCG GTGTCCAGCA AGAGATCCAT 1680
CAAGCCGTCG CGATG 1695

<210> 7

<211> 365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> deleted E1 promoter

<400> 7

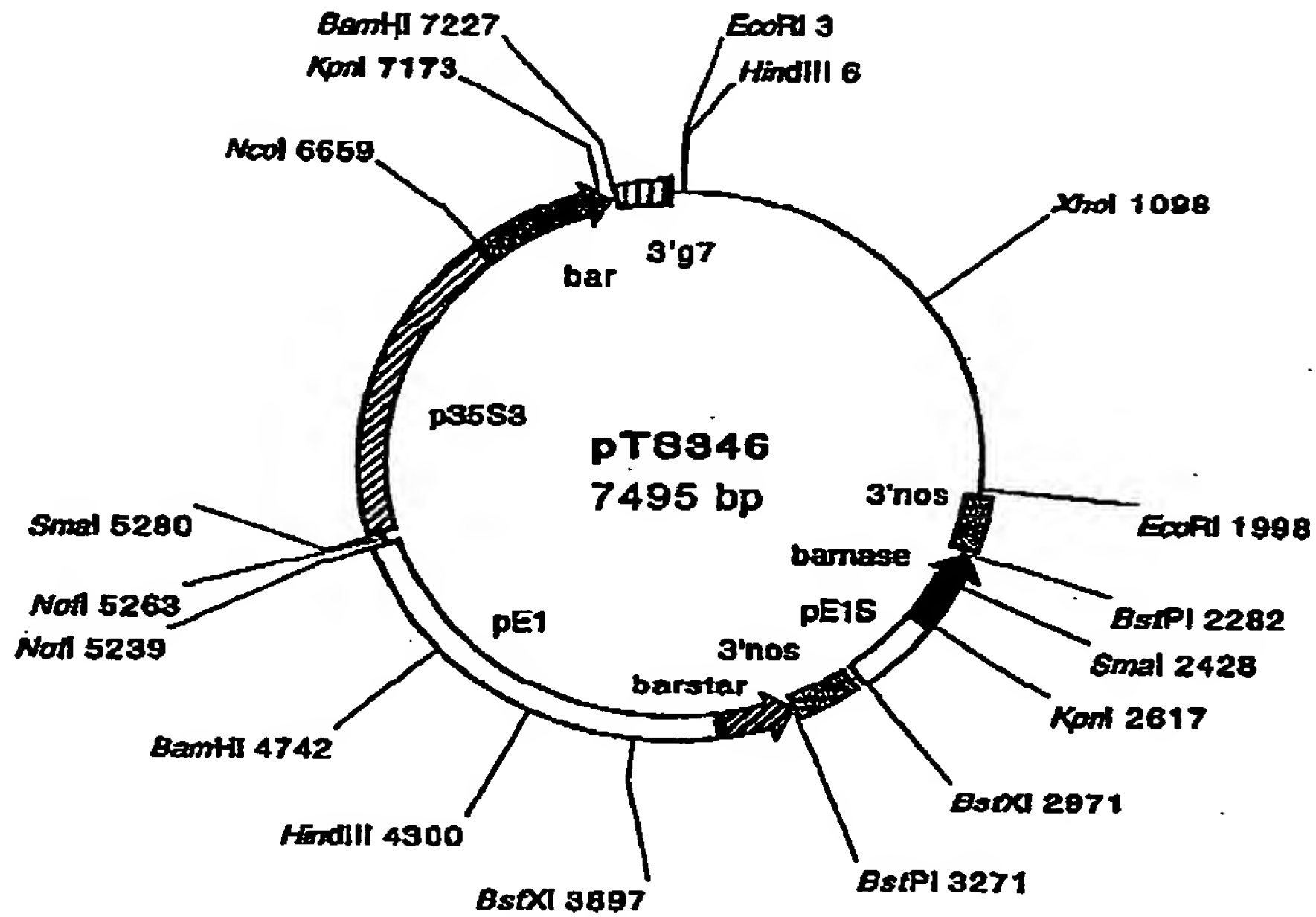
TCAGCCAGAC CAATGGGGGC AAAATTTACT ACTATTTGCC ATACATTAAC CACGTAAAAG 60
TCCTACACTC AACCTAACTG TTGAACGGTC CTGTTCTGGC CAACGGTGAG AATGCACCTA 120
ATGGACGGGA CAACACTTCT TTCACCGTGC TACTGCTACA TCCTGTAGAC GGTGGACGCG 180
TGAGGTGCTT TCGCCATGAC CGTCCTTGGT TGTTGCAGTC ACTTGCGCAC GCTTGCACCG 240
TGA CTCACCT GCCACATTGC CCCC GCCGTC GCCGGCGCCT AAAAAAGCCA CACACGCACG 300
CCGGCCACGA TAACCCATCC TAGCATCCCG GTGTCCAGCA AGAGATCCAT CAAGCCGTCG 360
CGATG 365

【図面の簡単な説明】

【図 1】 pTS346の構造を、模式的に示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 雄性不稔性であることを除く原品種と同様な正常な形態を示す雄性不稔植物を作出する方法を提供する。

【解決手段】 RNA分解酵素遺伝子上流にプロモーターの断片を結合し、RNA分解酵素阻害蛋白遺伝子上流に前記プロモーターと同一又は異なるプロモーターを結合し、植物ゲノム中に導入することにより、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする雄性不稔植物の作出方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 4 5 6 9]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 5 月 1 6 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号
氏 名	日本たばこ産業株式会社